

新規な抗血液凝固剤

[0001]

発明の属する技術分野

- 5 本発明は、血液の凝固を阻止する事によって血栓症状を予防するまたは治療するために用いられる、あるいは医療用具の表面処理のために用いられる抗血液凝固剤に関するものである。

[0002]

背景技術

- 10 ヘパリンは哺乳動物（牛、子羊、豚）の腸あるいは肺に存在する。ヘパリンは硫酸基を有するムコ多糖であり、抗血液凝固作用を有する。このためヘパリンは、血液凝固系異常が原因である疾患の治療や予防、人工透析時や人工心肺を用いる場合の体外循環血液の凝固抑制などに用いられている。さらにヘパリンは生体内に導入する医療器具が血液を凝固させないようにする為にも用いられている。
- 15 血液の凝固は多数のタンパク質分解酵素が一定の順序で互いに活性化する複雑な系（カスケード様行程）である。このカスケード様行程において、ヘパリンが作用するメカニズムも徐々に明らかになっている。

- このようにヘパリンは貴重な薬物である。しかし、非常に多い量のヘパリンを投与した場合、出血などの合併症が見られる場合がある。これはヘパリンが血液凝固系の内、
- 20 内因系と外因系のどちらの系にも作用する為である。

- 近年、ヘパリンの低分子量フラクション（LMWヘパリン）が、ヘパリンと違って内因系血液凝固因子にのみ作用する事が明らかとなった。これはLMWヘパリンがヘパリンと類似の特異的抗X a 因子活性を有し、全体的凝固を抑制する活性が低い事を意味する。すなわち、LMWヘパリンはヘパリン同様に抗血液凝固活性を有しながら、なおかつ
- 25 出血などの合併症をおこすことが少ない。

[0003]

LMWヘパリンの製造方法は以下のものが検討されてきた。

- ・ヘパリンを酸・アルカリなどで分解して低分子量化する化学的分解法（例えば、特開

昭63-191801号公報、特開平2-64102公報)

・ヘパリンを酵素により解重合して低分子量化する酵素的分解法 (例えば、特開平3-247297号公報)

LMWヘパリンはこのようにヘパリンを原料として製造される。ヘパリンは高価であり、なおかつこのような製造工程が必要であるため、LMWヘパリンは非常に高価なものとなる。また、前述したようにヘパリンは牛・子羊・豚などの肺・腸から抽出されるので、ヘパリンにウィルスやプリオンタンパク質が混入する事を防ぐのは非常に困難である。このため牛臓器から抽出されたヘパリンは、牛海綿状脳症 (BSE) の流行以来、使用が禁止された。それに伴ってヘパリンの価格も急騰した。この様な理由から、安全かつ安価な、新規な抗血液凝固剤が必要とされている。

[0004]

発明の概要

本発明の血液凝固剤は、グルコースとグルクロン酸とラムノースの存在比が2モル：1モル：1モルである構成単位を有する多糖を原料とし、該原料多糖の水酸基を部分的に硫酸化した多糖、またはその硫酸化多糖を部分構造として有する化合物である。

[0005]

詳細な説明

本発明者らは、前記の問題点を解決するために鋭意研究を行った結果、グルコースとグルクロン酸とラムノースの存在比が2モル：1モル：1モルである構成単位を有する多糖を原料とし、該原料多糖の水酸基を部分的に硫酸化した多糖が、ヘパリン、LMWヘパリンと同様の抗血液凝固活性を有することを見出した。

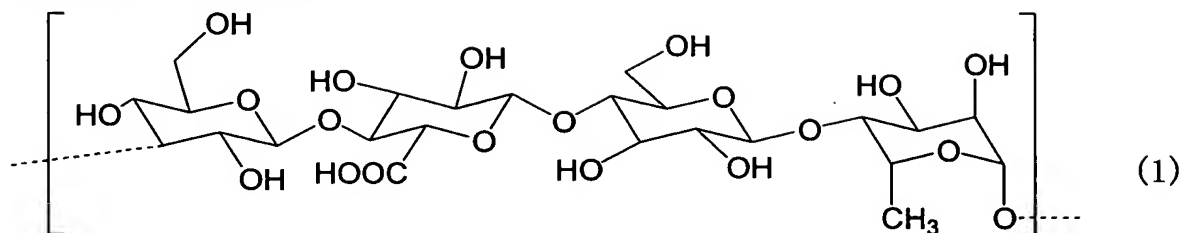
[0006]

本発明は下記の構成を有する。

(1) グルコースとグルクロン酸とラムノースの存在比が2モル：1モル：1モルである構成単位を有する多糖を原料とし、該原料多糖が有する水酸基の8～80%が硫酸化された多糖、またはその硫酸化された多糖を部分構造として有する化合物、を含有する抗血液凝固剤。

(2) 原料多糖が下記の式 (1) で示される構成単位を有する多糖である、前記 (1)

項に記載の抗血液凝固剤。



(3) 原料多糖がジェランである、前記(1)項に記載の抗血液凝固剤。

[0007]

(4) 原料多糖が有する水酸基の20～50%が硫酸化された多糖またはその硫酸化された多糖を部分構造として有する化合物を含有する、前記(1)項に記載の抗血液凝固剤。

(5) 硫酸化された多糖の平均分子量が1～1000KDaである、前記(1)項に記載の抗血液凝固剤。

(6) 硫酸化された多糖の平均分子量が1～30KDaである、前記(1)項に記載の抗血液凝固剤。

[0008]

(7) 前記(1)～(6)項のいずれか1項に記載の抗血液凝固剤を含む抗血栓症剤。

(8) 心筋梗塞、脳梗塞または静脈血栓の予防および治療に使用する事が出来る前記(7)項に記載の抗血栓症剤。

(9) 静脈内投与、腸管投与または経口投与用の単位製剤の形に加工する事により得られる前記(7)または(8)項に記載の抗血栓症剤。

[0009]

(10) 前記(1)～(6)項のいずれか1項に記載の抗血液凝固剤を含む、医療用具の血液接触面処理剤。

(11) 前記(10)項に記載の血液接触面処理剤を使用して処理された医療用具。

(12) 前記(10)に記載の血液接触面処理剤を使用して処理されたカテーテル、採血用注射器、人工臓器、輸液パックまたは輸液チューブ。

[0010]

以下、本発明を詳細に説明する。

本願第一の発明は、グルコースとグルクロン酸とラムノースの存在比が2モル：1モル：1モルである構成単位を有する原料多糖の水酸基が部分的に硫酸化された多糖を含有する抗血液凝固剤である。水酸基の硫酸化度、すなわち原料として使用する前記の多糖が有する水酸基を硫酸化した割合は8～80%であり、20～50%が好ましい。硫酸化された多糖の平均分子量は1～1000KDaが好ましく、1～30KDaがより好ましい。

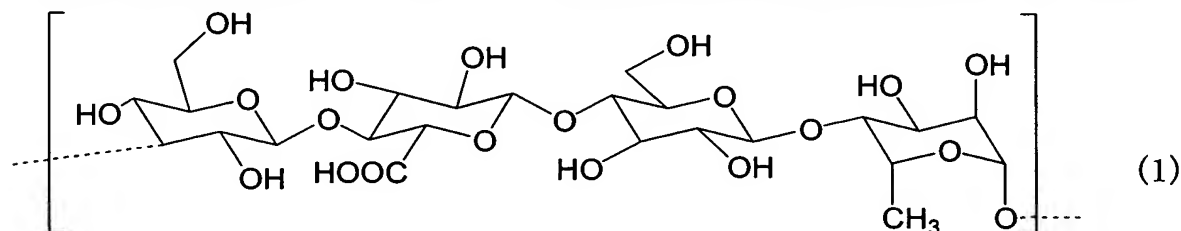
[0011]

本発明の抗血液凝固剤を構成する硫酸化多糖の原料として用いる多糖は、化学合成されたものであっても、天然由来の微生物の発酵産物や海藻抽出物などであってもよい。

原料の多糖の起源は特に限定されるものではない。また、原料の多糖はあらかじめ低分子量化してから硫酸化反応させる事が出来る。低分子量化の方法としては、塩酸、硫酸、トリフルオロ酢酸、その他の酸、水酸化ナトリウムなどのアルカリ化合物による加水分解や酵素による分解方法などが挙げられる。この他、低分子量化の方法は特に限定されるものではない。

15 [0012]

原料の多糖の具体例として、式（1）の構成単位を有する多糖をあげることができる。



[0013]

原料の多糖としてさらに具体的には、式（1）の構成単位からなる多糖、すなわち、シュドモナス エロデア（*Pseudomonas elodea*）が生産する多糖を脱アシル化したジェラン（gellan CAS 71010-52-1）があげられる。ジェランはグルコース、グルクロン酸、ラムノースが主成分である多糖で、安価に大量に入手することが可能である。よって本発明に好ましく使用する事ができる。

[0014]

多糖の硫酸化の方法は通常知られている方法が利用できる。例えば、インターナシヨ

ナル オブ ジャーナル オブ バイオロジカル マクロモレキュルズ

(International Journal of Biological Macromolecules) 28, 381 (2001)

に宮本 啓一らによって紹介された、ジメチルホルムアミド (DMF) 中でクロロスルホン酸を作用させる方法や、DMF 中で DMF/SO₃ 複合体を作用させる方法である。

- 5 また他に反応方法として、ジオキサソーン-SO₃ 複合体、トリメチルアミン-SO₃ 複合体、ピリジン-SO₃ 複合体などの無水硫酸複合体を作用させる方法が使用可能である。原料の多糖の分子量、反応条件を変えることにより、任意の分子量と硫酸化度を有する硫酸化多糖を得る事ができる。

[0015]

- 10 本発明の抗血液凝固剤には上記の硫酸化多糖が好ましく用いられる。また、本発明の抗血液凝固剤には、上記の硫酸化多糖を部分構造として有する化合物も同様に用いることができる。硫酸化多糖を導入する化合物の例は、アミノ基を有する多糖、アミノ基を有するポリアミノ酸、およびアミノ基を導入した多糖などがあげられる。アミノ基を有する多糖の具体例はキトサンである。アミノ基を有するポリアミノ酸の具体例はポリリ
- 15 ジンである。アミノ基を導入した多糖の具体例はアミノ化セルロースである。その他、本発明の硫酸化多糖の抗血液凝固性が無くならなければ、硫酸化多糖にどのような化合物を結合しても良い。

[0016]

- 硫酸化多糖を上記の化合物に導入する方法の例として以下の方法がある。水溶性カル
- 20 ボジイミド (WSC) を触媒に用いて、硫酸化多糖のカルボキシル基と化合物のアミノ基を結合する方法、硫酸化多糖の還元末端アルデヒド基と化合物のアミノ基を弱アルカリ条件下で反応させ還元剤 (テトラヒドロホウ酸ナトリウムやジメチルアミンボラン等) で処理して結合させる方法など。その他、本発明の硫酸化多糖の抗血液凝固性を失する物で無ければその結合方法は特に限定されるものではない。

- 25 [0017]

本願第2の発明は、本願第1の発明の新規な抗血液凝固剤を含む抗血栓症剤である。

前記の方法で作製した抗血液凝固剤は、ヘパリンおよびLMWヘパリンに対し通常なされている方法に準じた方法で、薬剤として投与可能な形態に変換できる。例えば本発

明の抗血液凝固剤を注射剤とするために水に溶解して使用できる。その際注射剤に調剤上許容される補助剤（防腐剤およびある種の塩など）を添加することもできる。このような注射剤は、皮下又は静脈内注射（適切には間欠的に）もしくはインフュージョンとして、臨床的に使用される。他の投与方法として、スプレー吸入による肺内投与、又は
5 軟膏剤やクリームによる経皮投与、又は坐薬による粘膜投与も可能である。

[0018]

調製された抗血栓症剤は、心筋梗塞、脳梗塞または静脈血栓の予防および治療に用いることができる。これらの疾患は血管中での血液凝固による血栓形成が引き金となって起こる。本抗血栓症剤は、血栓形成の初期段階における血栓形成の進行を遅延させる事が出来る為、予防および治療の目的として非常に有効である。これら抗血栓症剤の投与方法は病態に応じて適切に行われる必要がある。本抗血栓症剤の主な投与手法としては、
10 注射による皮下投与や静脈投与、錠剤化しての経口投与、坐薬としての腸管投与などが挙げられる。この他、軟膏剤や湿布剤による経皮投与やスプレー吸入による肺内投与など、適切な形態を選択するのであればいかなる投与方法、薬剤形態としても何ら問題ない。
15

[0019]

本願第3の発明は、本願第1の発明の新規な抗血液凝固剤を含む医療用具の血液接触面処理剤である。また、当該処理剤を使用して処理した医療用具である。

血液と接触するカテーテル、採血用注射器、人工臓器、輸液パック、輸液チューブなどに代表される医療用器具は、血液凝固の阻止を目的にヘパリンなどによる表面処理がなされている。本発明の抗血液凝固剤もこれらと同様に医療用器具表面での血液凝固の阻止に使用できる。医療用具の表面を処理する具体的な方法の例は、医療用具の表面を、硫酸化多糖を物理吸着または化学結合させることができる置換基で修飾し、硫酸化多糖を医療用具表面に物理吸着または化学結合させる方法がある。また、硫酸化多糖を他の
25 置換基を有する化合物と結合させ、その化合物を利用して医療用具表面に結合させる方法がある。また、硫酸化多糖の一部を他の置換基で置換し医療用具表面に結合させる方法がある。この他、抗血液凝固性が無くならないければ、本発明の抗血液凝固剤をいかなる方法で医療用具表面に結合させても良い。

[0020]

本発明によりヘパリンと同様の抗血液凝固作用を有し、かつLMWヘパリンと同様の特異性を有する新しい抗血液凝固剤を、ヘパリンおよびLMWヘパリンより安価に提供
5 する事が可能となった。この抗血液凝固剤は抗血栓症剤や医療用具の血液接触面処理剤
に使用することができる。

[0021]

実施例

以下、本発明について実施例および比較例を用いて詳細に説明するが、本発明はこれ
らの実施例に限定されるものではない。実施例において使用する用語の定義および測定
10 方法は以下の通りである。

(1) 平均分子量 (KDa) : 合成した硫酸化多糖を 0.2 mol/l - NaCl 水溶
液 (イオン交換水にて調製) に 1.0 mg/ml の濃度で溶解し、同じ NaCl 水溶液
を溶出液とした HPLC によるゲルろ過法により平均分子量を測定した。カラムは Sh
odex Ionpak KS-804 および KS-G を使用した。溶出物の検出は示差
15 屈折率検出器により行った。別途測定した分子量既知のプルラン (Shodex ST
ANDARD P-82) により溶出時間と分子量の検量線を作成し、検量線に当ては
める事で当該物質の平均分子量を決定した。

(2) 水酸基の硫酸化度 (%) : 原料多糖が有する水酸基のうち硫酸化された割合を百
分率で表示した。合成した硫酸化多糖の全 S 量を ICP により測定し、イオンクロマト
20 グラフィーにより硫酸化多糖本体から遊離した遊離 S 量を測定した。全 S 量から遊離 S
量を差し引いた結合 S 量から水酸基の硫酸化度を算出した。

(3) 正常血液凝固時間 (秒) : プラスチック試験管 (IWAKI 社製 3.3 ml 採血
管) に硫酸化多糖を $50 \mu\text{l}$ であらかじめ分注し (濃度は最終濃度が測定濃度になるよ
うに調製しておく)、健常者から採血した直後の血液を硫酸化多糖の入った試験管に 1
25 ml ずつ加え、すばやく混和し、試験管を反復傾斜させ流動性が消失した時間 (秒) を
計測した。

[0022]

(4) 活性化部分トロンボプラスチン (APTT) 時間 : 本法は内因系凝固の動態を検

- 査する方法である。本法は第XII因子、第XI因子、高分子キニノゲン、プレカリクレイン、第IX因子、第VIII因子、第X因子、第V因子、第II因子（プロトロンビン）、第I因子（フィブリノーゲン）の質・量的異常に感受性を持つ。まず、クエン酸採血（1/10容量の3.13wt%クエン酸ナトリウムを添加したプラスチック試験管に
- 5 採血）した正常（健常者ボランティア）血液を、3000rpmで10分間遠心分離し上清血漿を得た。APTT時間は、被検血漿とAPTT試薬を混和後、塩化カルシウム液を加えた後のフィブリン析出時間（秒）を計測することで得られた（自動測定装置使用）。被検血漿には硫酸化多糖を添加濃度0.001~1mg/mlで添加し、基準対照は正常血漿を用いた。
- 10 (5) プロトロンビン（PT）時間：本法は外因系凝固の動態を検査する方法である。本法は第II因子（プロトロンビン）、第V因子、第VII因子、第X因子、第I因子（フィブリノーゲン）の質・量的異常に感受性を持ち、第IX因子、第VIII因子の影響はほとんど受けない。まず、クエン酸採血（1/10容量の3.13wt%クエン酸ナ
- 15 トリウムを添加したプラスチック試験管に採血）した正常（健常者ボランティア）血液を、3000rpmで10分間遠心分離し上清血漿を得る。PT時間は、被検血漿とPT試薬（組織トロンボプラスチン・塩化カルシウム混合液）を添加しフィブリン析出時間（秒）を計測することで得られた（自動測定装置使用）。被検血漿には硫酸化多糖のサンプルを添加濃度0.001~1mg/mlで添加し、基準対照は正常血漿を用いた。
- [0023]

20 実施例1

- ジェラン（和光純薬製）2gをあらかじめ0.5mol/l-トリフルオロ酢酸水溶液200mlに添加し80℃下で30分間反応させ加水分解した。得られた低分子量化ジェランを窒素ガスシール下でDMF 5gに添加し10時間、室温で攪拌し膨潤させた。その後、反応溶液の温度を40℃に上げてDMF/SO₃ 錯体（SO₃ 18wt%）
- 25 を14g添加し6時間反応させた。反応終了後、反応溶液を氷冷し0.3gの水を添加して未反応のDMF/SO₃ 錯体を分解、反応停止した。続いて反応溶液に2倍容量のエタノールを添加し、溶解している反応物を沈殿させ濾過により回収した。回収した沈殿を20mlのイオン交換水に溶解し1mol/l-NaOHにて中和し、再び2倍容

量のエタノールにて沈殿させ回収した。その後、本方法での精製・洗浄を計3回行い、50℃下で一日減圧乾燥し、硫酸化ジェランの粉末1.7g（収率61%）を得た。得られた硫酸化ジェランの平均分子量を前述の手法で測定したところ8.4KDaであった。又、水酸基の硫酸化度は24.4%であった。

5 [0024]

得られた硫酸化ジェランのAPTT時間とPT時間を測定した。その結果APTT時間は、硫酸化ジェラン未添加のサンプルが30秒であったのに対し、硫酸化ジェランを1mg/mlの添加濃度で添加したサンプルでは95秒に延長していた。PT時間には有意な時間の延長は見られなかった。

10 [0025]

実施例2

使用原料として低分子量化していない通常のジェランを2g用い、硫酸化剤にクロロスルホン酸を3.6g使用し、反応温度を50℃で行った以外は実施例1に準じた手法で硫酸化した。その結果、得られた硫酸化ジェランの平均分子量は23KDa、水酸基の硫酸化度は36.6%であった。得られた硫酸化ジェランのAPTT時間、PT時間および正常血液を使用した凝固時間を測定したところ以下の表1の結果を得た。

15

[0026]

表1

硫酸化ジェランの 添加濃度 (mg/ml)	PT (秒)	APTT (秒)	正常血液凝固時間 (分)
0 (基準対称)	12.6	35	42.5
0.001	11.6	38.1	54
0.01	11.7	30	93
0.1	15.8	300 以上	230
1	300 以上	300 以上	600 以上

[0027]

実施例3

使用原料として実施例 1 に準じた手法で低分子量化したジェランを使用した他は実施例 2 と同じ条件で硫酸化した。その結果、分子量が 13 KDa、水酸基の硫酸化度が 39.8%の硫酸化ジェランが得られた。得られた硫酸化ジェランの APTT 時間、PT 時間および正常血液を使用した凝固時間を測定したところ以下の表 2 の結果を得た。

5 [0028]

表 2

硫酸化ジェランの 添加濃度 (mg/ml)	PT (秒)	APTT (秒)	正常血液凝固時間 (分)
0 (基準対称)	12.6	35	42.5
0.001	11.3	49	58.9
0.01	11.8	103.5	138.8
0.1	19.3	300 以上	216.3
1	300 以上	300 以上	600 以上

[0029]

実施例 4

クロロスルホン酸の添加量を 18 g で行った他は実施例 3 と同じ条件で硫酸化したところ、分子量が 9 KDa、水酸基の硫酸化度が 46.4%の硫酸化ジェランを得た。得られた硫酸化ジェランの APTT 時間、PT 時間および正常血液を使用した凝固時間を測定したところ以下の表 3 の結果を得た。

10

[0030]

表 3

硫酸化ジェランの 添加濃度 (mg/ml)	PT (秒)	APTT (秒)	正常血液凝固時間 (分)
0 (基準対称)	12.6	35	42.5
0.001	13	45	39.9
0.01	12	45	72
0.1	14	300 以上	600 以上
1	300 以上	300 以上	600 以上

[0031]

比較例 1

- DMF/SO₃ 錯体の添加量を 0.4 g で行った他は実施例 1 に準じた手法で硫酸化した。その結果、平均分子量 9 KDa、水酸基の硫酸化度 5% の硫酸化ジェランが得られた。その硫酸化ジェランを 1 mg/ml 添加しても正常血液凝固時間の延長は認められなかった。

[0032]

比較例 2

- 硫酸化ジェランに代えて、ヘパリン (Scientific Protein Laboratories 製) の APTT 時間、PT 時間および正常血液を使用した凝固時間を測定したところ、以下の表 4 の結果を得た。

[0033]

表 4

ヘパリンの 添加濃度 (mg/ml)	PT (秒)	APTT (秒)	正常血液凝固時間 (分)
0 (基準対称)	12.6	35	42.5
0.001	13	50	105.6
0.01	13	300 以上	600 以上
0.1	300 以上	300 以上	600 以上
1	300 以上	300 以上	600 以上

[0034]

- 比較例 3

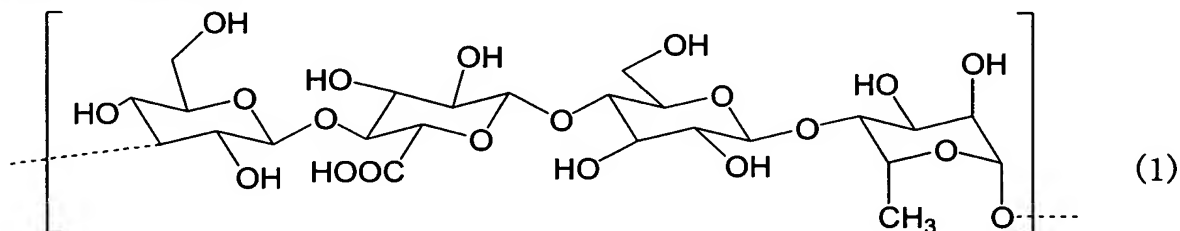
硫酸化ジェランに代えて、硫酸化多糖として代表的な市販のコンドロイチン硫酸 (和光純薬製) について、正常血液を使用した血液凝固時間を測定した。この場合は 0.01 mg/ml の添加でもまったく血液凝固時間の延長は観察されなかった。

特許請求の範囲

1. グルコースとグルクロン酸とラムノースの存在比が2モル：1モル：1モルである構成単位を有する多糖を原料とし、該原料多糖が有する水酸基の8～80%が硫酸化された多糖またはその硫酸化された多糖を部分構造として有する化合物、を含有する抗血液凝固剤。

5

2. 原料多糖が下記の式（1）で示される構成単位を有する多糖である、請求項1に記載の抗血液凝固剤。



3. 原料多糖がジェランである、請求項1に記載の抗血液凝固剤。
4. 原料多糖が有する水酸基の20～50%が硫酸化された多糖またはその硫酸化された多糖を部分構造として有する化合物を含有する、請求項1に記載の抗血液凝固剤。
5. 硫酸化された多糖の平均分子量が1～1000KDaである、請求項1に記載の抗血液凝固剤。
6. 硫酸化された多糖の平均分子量が1～30KDaである、請求項1に記載の抗血液凝固剤。
7. 請求項1～6のいずれか1項に記載の抗血液凝固剤を含む抗血栓症剤。
8. 心筋梗塞、脳梗塞または静脈血栓の予防および治療に使用する事が出来る請求項7に記載の抗血栓症剤。
9. 静脈内投与、腸管投与または経口投与用の単位製剤の形に加工する事により得られる請求項7または8に記載の抗血栓症剤。
10. 請求項1～6のいずれか1項に記載の抗血液凝固剤を含む、医療用具の血液接触面処理剤。
11. 請求項10に記載の血液接触面処理剤を使用して処理された医療用具。
12. 請求項10に記載の血液接触面処理剤を使用して処理されたカテーテル、採血用注射器、人工臓器、輸液パックまたは輸液チューブ。

要約

- 本発明は、グルコースとグルクロン酸とラムノースの存在比が2モル：1モル：1モルである構成単位を有する多糖、好ましくは式（1）の構成単位を有する多糖、更に好ましくはジェランの水酸基を部分的に硫酸化した化合物を含む抗血液凝固剤、およびこの血液凝固剤を含む抗血栓症剤または医療用具の血液接触面処理剤である。

